

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32667

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23757

研究課題名(和文) ヒト歯肉幹細胞と新規培養技術を応用したin vitroにおける3次元骨組織の作製

研究課題名(英文) Three-dimensional bone formation from human gingival stem cells in vitro by new culture method

研究代表者

渡邊 美穂 (Watanabe, Miho)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・非常勤講師

研究者番号：20845317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯の無い人からも採取可能なヒト歯肉組織由来の幹細胞から還流培養法を用いてin vitroで骨組織を作製し、in vitroでの骨実験モデルの確立および新たな骨移植材料作製を目指した。歯肉幹細胞から分化誘導して作製した骨芽細胞シートと骨芽細胞ビーズを組み合わせることで、構造形態の異なる緻密骨と海綿骨の2構造を培養下で同時に作製することができた。また骨内部には骨細胞を含む骨小腔や同心円状のハヴァース層板様構造が多数観察された。一部では血管様構造や多核の破骨細胞様細胞が認められ、生体内の骨と類似した構造をもつ培養骨組織作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト歯肉を細胞源として培養下で骨組織を作製できれば、多くの人で応用可能な移植材料として用いることができる。自己の細胞から作られた培養骨組織では、移植の際に問題となる感染や免疫の心配はなく、自家骨移植のような二次的的外科侵襲も不要である。また、現在骨をターゲットにした研究ではマウス等の生体を用いた研究が主体となっているが、in vitroの骨実験モデルであれば生体内の複雑な調節メカニズムを単純化することができ、創薬の開発等に多大な貢献ができる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated bone tissues from human gingival stem cells in vitro using the reflux culture method and the aim was to establish an in vitro bone experiment model and to prepare a new bone graft material.

We individually created compact bone layer and spongy bone layer in the same bone tissue by combining osteoblast sheets and osteoblast beads made from human gingival stem cells. Inside this bone, many bone lacunae containing osteocytes and Haversian canal-like structures were observed. Furthermore, vascular-like structures and multinuclear osteoclast-like cells were observed in some. Therefore, we succeeded in producing cultured bone tissue with a structure closely resembles native bone tissue.

研究分野：再生医療

キーワード：ヒト歯肉幹細胞 培養骨組織 組織工学 還流培養法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

生体内の骨欠損は様々な原因で生じ、機能や症状改善のため薬剤療法や骨移植等が行われている。近年、細胞・足場・成長因子を組み合わせた組織工学が骨欠損の新しい治療法の選択肢として注目を集めている。このアプローチは骨欠損部を補うだけではなく、既存細胞の増殖と分化を刺激することも目的としている。さらに、自己細胞から作られた骨組織は感染や免疫の問題もなく、自家骨移植のような二次的の外科侵襲もない。また現在数多くの骨系統疾患が存在するが未だ有効な治療法が見つからないものが多いのも現実で、病態解明や治療法の開発が急務となっている。骨をターゲットにした研究ではマウス等の動物の生体を用いた実験が主体となっているが、in vitro の骨実験モデルがあれば生体内の複雑な調節メカニズムを単純化することができ、新たな直接的知見を得ることができる。申請者はこれまでヒト歯髄幹細胞から還流培養法を用いて in vitro で骨組織を作製してきた<sup>1)</sup>。この方法では細胞シート法と細胞ビーズ法を組み合わせることで緻密骨と海綿骨を自在に構築することができた。また、内皮細胞ビーズを用いることで骨組織内に血管構造を組み込むことができ、これにより骨組織内部の壊死を防ぐことが可能になった。しかし、ヒト歯髄を細胞源とすると歯の無い人や歯科治療により抜髄処置を受けた歯では応用が不可能となる。そこで本研究では、より低侵襲で採取が容易であり、ヒト歯髄幹細胞と類似した特性を示すヒト歯肉幹細胞に着目した<sup>2, 3)</sup>。今回はより多くの人に应用可能なヒト歯肉幹細胞を用いて、新たな骨移植材料および in vitro の骨実験モデル作製法の確立を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト歯肉幹細胞から in vitro で骨組織を作製し、その特性を評価することで、新たな骨移植材料および骨実験モデル作製のための培養方法を確立することである。申請者らは還流培養法を応用することで、in vitro でヒト歯髄幹細胞から骨組織を作製する独自の骨培養法を開発した<sup>1)</sup>。本法では細胞シート法と細胞ビーズ法、さらに内皮細胞ビーズを組み合わせることで血管網を内在する緻密骨層と海綿骨層の2層構造を構築でき(図1)、各層の厚みや骨梁密度も調整可能である。また鋳型の形状を変化させることで様々な形の培養骨を作製できる。骨組織内部に血管網を内在させることで内部壊死を防ぎ(図2)、これは移植した際の生着率向上に寄与すると考えている。自己の細胞から作製された骨は、免疫や感染の点でも問題がない安全な移植材料として使用できると考えている。また in vitro の骨実験モデルは生体内の複雑かつ多様な働きを単純化でき、骨のみに焦点を当てた研究が可能となるため新たな知見を生みだし得る点で重要だと考えている。本研究では歯のない人でも応用可能なヒト歯肉幹細胞に着目し、独自の培養技術を用いて in vitro で培養骨組織を作製、評価することで、新たな骨移植材料および骨をターゲットにした創薬研究等に应用可能な in vitro の骨実験モデルの創出を目指す。



図 1. ヒト歯髄幹細胞から 30 日間の還流培養で作製した骨組織の実態顕微鏡像。Scale bar: 5 mm

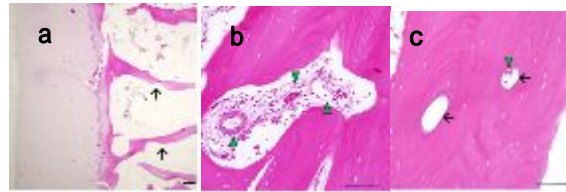


図 2. 培養骨組織の HE 染色像: (a)緻密骨と海綿骨の 2 層構造。矢印で骨梁を示す。scale bar: 200  $\mu$ m : (b)骨組織内部の血管構造 (矢頭) を示す。: (c)ハヴァース管様構造( )を認めた。Scale bars: 50  $\mu$ m

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯肉幹細胞の分離および骨分化誘導

口腔手術の切除検体より健康歯肉を採取し、その歯肉から酵素法を用いてヒト歯肉間葉細胞を分離する。歯肉間葉細胞の初代培養細胞から薄撒き法で濾紙を用いてコロニアルクローニングを行い、歯肉幹細胞を分離し、免疫染色で細胞評価を行う。幹細胞であることが確認できた後、分離した歯肉幹細胞に骨分化誘導培地( MEM にデキサメタゾンとアスコルビン酸と グリセロフォスフェートを添加)で 3 週間骨分化誘導をかけ、分化誘導した骨芽細胞をアリザリンレッド S 染色にて評価する。

#### (2) 還流培養による培養骨組織作製

アテロコラーゲンビーズ表面に分化誘導した骨芽細胞および内皮細胞を別々に振とう培養法で付着させ、骨芽細胞ビーズと内皮細胞ビーズを作製する。骨芽細胞ビーズと内皮細胞ビーズを鋳型内で混和し、約 17 時間静置培養を行う。その後、鋳型から取り出したものを海綿骨層ユニットとする。また、分化誘導した骨芽細胞を温度感受性シャーレに播種し骨芽細胞シートを作製する。この骨芽細胞シート上に内皮細胞ビーズを播種し、サンドウィッチ状にこの組み合わせを 10 層以上重ねて緻密骨層ユニットとする。海綿骨層ユニットと緻密骨層ユニットを重ね合わせ、骨形成培地( 10% FBS を含む DMEM/F 12 にカルシトニンと BMP2 と IGF-1 を添加)を用いて還流培養装置( 流速 2 ml/min)で 30 日間培養を行い、出来上がった培養骨組織を micro-CT、HE 染色、免疫染色で評価する。

### 4. 研究成果

切除検体より採取した健康歯肉を酵素法で細胞を分離し静置培養を行ったところ、大小様々なコロニーが散在した。濾紙法にてコロニアルクローニングを行いヒト歯肉幹細胞を分離および増殖させた(図 3)。免疫染色では幹細胞マーカーである nanog、sox2、oct4 の発現を確認した(図 4)。今回はこの細胞を歯肉幹細胞として使用した。

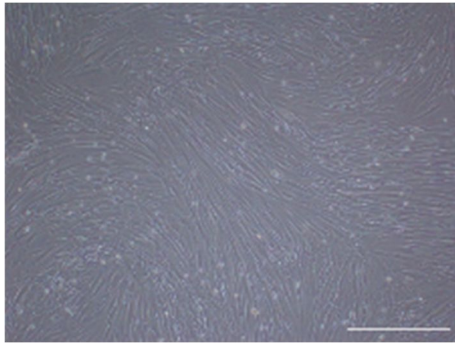


図 3. ヒト歯肉から分離・培養した  
歯肉幹細胞の位相差顕微鏡像  
Scale bar: 500  $\mu\text{m}$

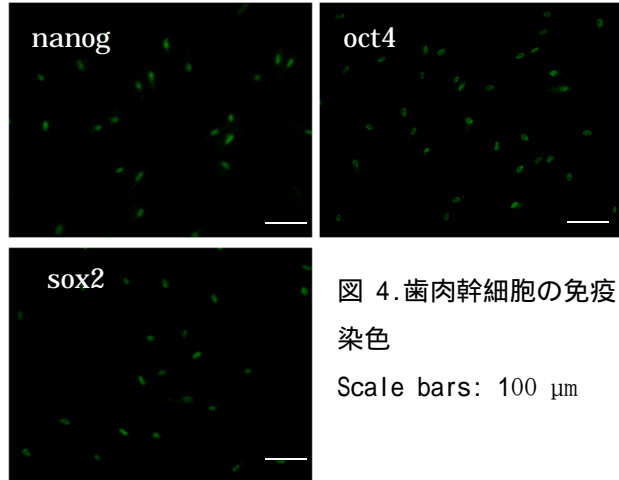


図 4. 歯肉幹細胞の免疫  
染色  
Scale bars: 100  $\mu\text{m}$

次に歯肉幹細胞に 3 週間骨分化誘導を行った。誘導後は位相差顕微鏡下で細胞形態の変化と石灰化物の形成が認められ、アリザリンレッド S 染色でカルシウム沈着を確認した (図 5, 6)。

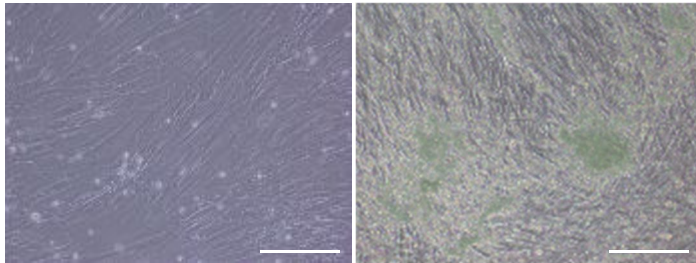


図 5. 歯肉幹細胞の骨分化誘導 Scale bars: 200  $\mu\text{m}$   
誘導開始前 (左) と誘導 3 週間後 (右) の位相差顕微鏡像



図 6. アリザリンレッド S 染色

骨分化誘導後の細胞を用いて骨芽細胞ビーズおよび骨芽細胞シートをそれぞれ作製した後、海綿骨層ユニット、緻密骨層ユニットを形成し 2 層を重ねて還流培養装置で 30 日間還流培養を行った。出来上がった培養骨組織を micro-CT で観察すると、緻密骨層と海綿骨層で形状の異なった 2 層が観察された。緻密骨層は平坦で厚みがある緊密な構造をしており、海綿骨層では細かい骨梁構造が疎に広がっているのが確認できた (図 7)。

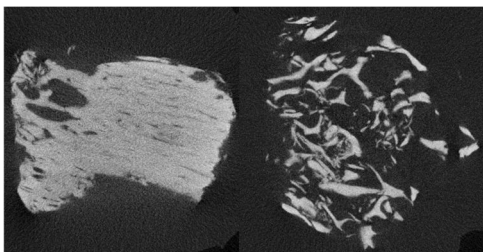


図 7. 培養骨組織の micro-CT 像  
緻密骨層 (左) と海綿骨層 (右) で異なる構造形  
態が観察された。

この 2 層は一体となっており、HE 染色でも 2 層の構造形態の違いは明らかであった (図 8)。骨組織内には内部に骨細胞が存在する多数の骨小腔が観察できた。また、同心円状のハヴァース層板様構造が認められ、その内部には血管様構造も観察された。海綿骨層部ではビーズ残渣が認められ、その周囲では幼弱な骨梁構造の形成が確認できた。

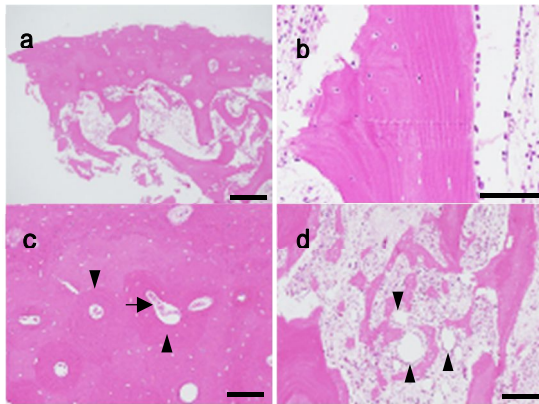


図 8. 培養骨組織の HE 染色像

(a)緻密骨と海綿骨が一体となった骨組織。Scale bar: 500  $\mu$ m (b)骨小腔内に骨細胞が存在。(c)同心円状のハヴァース層板様構造(矢頭)と血管様構造(矢印)。Scale bars: 100  $\mu$ m (d)ビーズ残渣(矢頭)の周囲に幼弱な骨形成が観察される。Scale bar: 200  $\mu$ m

また一部で、エオジンに強染を示す多核の破骨細胞様細胞が観察された(図 9)。この破骨細胞様細胞と骨基質との間には破骨細胞が骨時吸収した際に生じるハウシッポ窩様のくぼみも観察され、このことから作製した骨組織は生体内の骨と類似した構造を有し、加えてリモデリング能も兼ね備えている可能性が示唆された。この破骨細胞様細胞は内皮細胞ビーズ作製の際に、血管腔を形成させるため、ビーズ内部に入れた末梢血由来であると考えている。この培養骨組織を骨形成マーカー(osteopontin、osteocalcin)を用いて免疫染色すると、石灰化が幼弱な部分では osteopontin に陽性反応を示し、成熟した部分では osteocalcin に陽性反応を示した(図 10)。

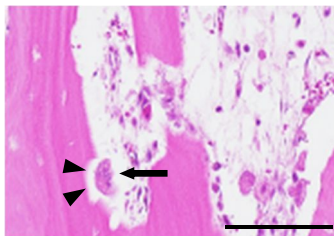


図 9. 多核の破骨細胞様細胞(矢印)が観察された。骨基質との間にはハウシッポ窩様の構造(矢頭)も確認できる。Scale bar: 100  $\mu$ m

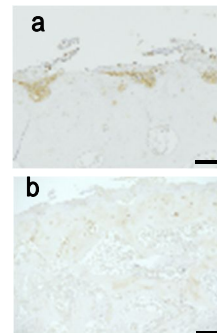


図 10. 免疫染色像  
(a) Osteopontin  
Scale bar: 200  $\mu$ m  
(b) Osteocalcin  
Scale bar: 500  $\mu$ m

今回ヒト歯肉を細胞源として in vitro での培養骨組織作製に成功した。

出来上がった骨組織は生体内の骨と類似した構造を持ち、リモデリング能も兼ね備えている可能性が示唆された。しかし血管様構造は一部でしか観察されず、今後移植材料として使用するためにはさらに多くの血管網構造が骨内部にできるように内皮細胞ビーズの量や大きさ等を検討していく必要があると考える。また今回は実際に出来上がった培養骨組織を生体内に移植することができなかったが、培養骨内部に血管網構造が豊富に作られれば高い生着能が望めるため、今後の検討課題としたい。歯肉を細胞源とした培養骨組織は多くの人で応用可能であり、将来臨床応用の際は患者自身の細胞と血液(血清と赤血球)を用いることで感染や免疫に問題の無い骨移植が行えると考えている。

#### <引用文献>

- 1) Watanabe, M et al. Human Cell, 32: 114-124, 2018
- 2) Deepak, V et al. J Oral Maxillofac Pathol, 21: 296-298, 2017
- 3) Tomasello, L et al. Stem Cell Res Ther, 8: 179, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------